растания эпизоотического неблагополучия по антропургическому бешенству необходимо усилить ответственность владельцев за нарушение правил содержания животных, ввести штрафы за отказ от иммунизации против бешенства, ввести обязательную регистрацию собак и кошек в ветеринарных учреждениях области.

Выводы

Бешенство антропургического типа имеет стойкую тенденцию к росту за последние 25 лет;

Особенностями клинического проявления болезни определяется значимость собак и кошек в эпизоотологии бешенства и распространении гидрофобии среди людей;

Для предотвращения нарастания эпизоотии бешенства необходимы совместные усилия ветеринарных специалистов, коммунальных служб и владельцев животных.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены данные по распространению бешенства домашних плотоядных животных в Курской области за 25 лет. Проанализированы причины роста бешенства антропургического типа. Описаны клинические признаки заболевания у собак и кошек.

SUMMARY

The research presents the data of spreading of rabies in domestic and carnivorous animals in Kursk Region for the period of 25 years. It analyzes the cause of rabies of urban type and gives clinical symptoms of the disease in dogs and cats.

Литература

1. Бакулов И.А., Котляров В.М.//Материалы международной научно-практической конференции «Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей» - г. Покров, 2002 - С. 5-16.
2. Ведерников В.А., Шабейкин А.А., Харкевич А.А. и др.//Ветеринарная патология. -2002, № 1 - С. 52-58.
3. Мовсесянц А.А., Агеенко Г.Б.//Ветеринарная патология. - 2002, № 1 - С. 48-51.
4. Smith JS: New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. Clin Microbiol Rev 9:166, 1996
5. http://www.veterinar.ru.

УДК: 619:616.98:578.833.3

О.В. Кунгурцева, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов

(ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии), пос. Краснообск, Новосибирская область

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕННОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ - БОЛЕЗНИ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, НА РЕЗУЛЬТАТЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Ключевые слова: вариабельность вируса, ВД-БС КРС, диагностика серологическая, биотип, генотипы, субгенотипы вируса.

Введение

Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС) широко распространена во всем мире. У восприимчивых животных вирус ВД-БС КРС может вызывать различные клинические синдромы, но наиболее характерными и экономически значимыми последствиями этой инфекции для индустрии скотоводства являются репродуктивные проблемы и респираторные болезни телят [2].

Возбудитель болезни относится к роду *Pestivirus* семейства Flaviviridae и существует в виде двух биотипов: цитопатогенного и нецитопатогенного. У него выявлены два генотипа, антигенно различающиеся между собой. Первый генотип распространен во всем мире и включает 11 субгенотипов [12], а второй представлен двумя субгенотипами и выделяется значительно реже [9, 10]. Широкое распространение вируса в популяции крупного рогатого скота создает значительные трудности в борьбе с болезнью.

На характер эпизоотической ситуации при данной болезни влияет ряд факторов:

1. Мутации и рекомбинации в геноме

вируса, обусловливающие возникновение различных генетических вариантов, приводящих к появлению новых штаммов в стационарно неблагополучных очагах;

2. Наличие персистентно инфицированных животных, являющихся постоянным источником вируса для неиммунных животных;

3. Присутствие животных с острыми формами инфекции, являющихся кратковременными (2-3 недели) источниками возбудителя инфекции;

4. Частота ввода новых животных-вирусоносителей, инфицированных различными генотипами или субгенотипами вируса.

Животные, переболевшие ВД-БС КРС в острой форме, приобретают пожизненный иммунитет к инфицирующему штамму вируса, однако полностью или частично восприимчивы к инфицированию штаммами других генетических групп [4, 5]. Поэтому большое значение в возникновении клинических признаков инфекции имеет факт смешивания животных из различных источников на конкретной территории. Такие ситуации могут возникать при закупке животных, особенно из других стран. В данном случае может происходить обмен инфекционными агентами, имеющими различия на антигеном уровне, к которым нет иммунитета у аборигенных или импортных животных, а также – инфицирование вновь поступивших животных вирусом других субгенотипов, стационарно персистирующим у местных животных.

Кроме отличий на генетическом уровне существуют некоторые антигенные различия, как между генотипами, так и внутри них. По данным зарубежных авторов антигенные различия значительно выше в пределах генотипа, чем между генотипами [5, 6, 8]. Однако титры специфических антител у животных выше к гомологичному штамму вируса, чем к гетерологичному.

Референтным методом серологической диагностики болезни считается реакция нейтрализации в культуре клеток. Одной из главных проблем серологической диагностики является недостаточная стандартизация методик и антигенная вариабельность вируса [11].

В настоящей статье предпринята попытка изучения частоты выявления и величины титров вируснейтрализующих антител к вирусу ВД-БС КРС первого генотипа в реакции нейтрализации с использованием в качестве антигенов штаммов двух субгенотипов (1a и 1b).

Генотипирование штаммов проводили при помощи ОТ-ПЦР с использованием праймеров на высококонсервативный регион генома 5[1] UTR.

Исследовали пробы сыворотки крови от крупного рогатого скота различных половозрастных групп, включая поступающих по импорту и аборигенного скота из стад, куда не вводились новые животные.

При изучении распространения болезни исследовали пробы сыворотки крови, отобранные от животных однократно. Высчитывали средний процент проб, содержащих антитела к вирусу, от числа поступивших из хозяйств с наличием или отсутствием вспышек гинекологических или респираторных болезней. С целью установления сероконверсии к вирусу, свидетельствующей об активной вирусной инфекции, исследовали парные пробы сыворотки крови телят, нетелей и коров, отобранные с интервалом 30 дней. Всего исследовали 337 проб сыворотки крови, в том числе 40 парных.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2008–2009 гг. в 7 крупных молочных комплексах трех областей Сибири, где лабораторными методами были установлены вспышки болезни.

Постановку реакции нейтрализации осуществляли микрометодом с использованием перевиваемой культуры клеток коронарных сосудов теленка (КСТ) в 96-луночных плоскодонных микропланшетах. В качестве антигена использовали цитопатогенные штаммы вируса ВД-БС КРС первого генотипа – вакцинный штамм ВК-1(1b) и изолят Ирмень (1a), выделенный нами. В качестве ростовой использовали питательную среду Игла МЕМ производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН с однократным и двойным набором аминокислот и витаминов, 0,06% L-глутамина, 100 мкг/мл канамицина, эмбриональную сыворотку КРС «HyClone» (серия SH30088.03, № ASA28574), тестированную на наличие микоплазм и случайного вируса ВД-БС КРС.

Готовили двукратные разведения проб сыворотки крови, в которые добавляли в равных объемах (по 50 мкл) 100 $ТЦД_{50}$ вируса и инкубировали в течение 1 часа при 37° С в условиях 5% CO_2. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл суспензии культуры клеток КСТ в концентрации 3×10^5 , инкубировали при 37° С в тех же условиях в течение 78 часов. Реакцию учитывали по мере развития цитопатического дей-

ствия (ЦПД) вируса в контрольных лунках с зараженной культурой клеток без сыворотки крови от исследуемых животных. За титр вируснейтрализующих антител (ВНА) брали последнее разведение сыворотки, тормозящее на 50% ЦПД вируса.

Цифровые данные, указывающие значения титров ВНА переводили в логарифм по основанию 2 и определяли среднюю величину для каждой возрастной группы местных и импортных животных. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы «Microsoft Office Excel 2003». Степень достоверности полученных данных и разности в значениях титров ВНА к субгенотипам 1a и 1b определяли по критерию Стьюдента. Результаты считали достоверными при уровне значимости P < 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ эпизоотической ситуации показал, что в хозяйствах, куда не поступал импортный скот, болезнь проявлялась в субклинической, реже в острой форме у телят и нетелей. В основном наблюдалась умеренная инфекция, сопровождающаяся отказом от корма, угнетением, повышением температуры тела. Чаще заболевание протекало в респираторной форме ассоциативно с другими инфекциями. Вируснейтрализующие антитела к вирусу субгенотипа 1a выявляли у животных всех возрастов в средних титрах 2,09±0,36 - 4,65±0,26; к субгенотипу 1b (ВК-1) - 2,75±0,26 - 4,32±0,17. Серопозитивность животных различных возрастных групп к субгенотипу 1a варьировала от 62,5 до 93,81%, к субгенотипу 1b – от 64,52 до 100%. Разница между титрами ВНА к двум субгенотипам не была достоверной (P > 0,05).

У нетелей и у телят 1-3 мес. возраста уровень ВНА к вирусу 1b был выше, чем к штамму 1a на 1,35±0,21 lg_2 и 1,24±0,26 lg_2, соответственно (разница достоверна, P < 0,05). Разброс титров антител у нетелей находился в пределах 1: 4 – 1: 128 к субгенотипу 1b и 1: 2 – 1: 16 к 1a; у телят в возрасте 1-3 мес. –1: 4 - 1: 64 к субгенотипу 1b и 1: 4 -1: 32 - к субгенотипу 1a.

У телят в возрасте 3 – 6 мес. и у быков титры антител к штамму 1a были выше, чем к штамму 1b на 0,34±0,11 lg_2 (разница не достоверна, P > 0,05) и на 0,79±0,14 lg_2 (разница достоверна, P < 0,05), соответственно. У телят в возрасте 3 – 6 мес. титры антител к двум субгенотипам находились в пределах 1: 2 – 1: 32, а у быков – 1: 4 -1: 128 к 1b и 1: 8 - 1: 128 к 1a.

Результаты ретроспективных серологических исследований в этих хозяйствах показали, что в некоторых из них частота сероконверсии у телят и нетелей к штамму 1b составляла 27,27% при уровне инфицированности стада 89,19%, а к субгенотипу 1a – 80% при таком же уровне инфицированности. Разброс титров антител находился в пределах 1: 4 – 1: 128 к субгенотипу 1b и 1: 2 – 1: 32 к 1a.

При исследовании парных проб сыворотки крови от телок случного возраста, полученных из молочно-товарного хозяйства Новосибирской области, вируснейтрализующие антитела к обоим субгенотипам вируса выявили в 93,04% исследованных проб в титрах 1: 2 – 1: 256, а сероконверсию – только к субгенотипу 1b у 45% животных.

Иная ситуация складывалась в хозяйствах при поступлении импортного скота. В них регистрировались острые вспышки инфекции, сопровождающиеся лихорадкой, отказом от корма, снижением молочной продуктивности, абортами, врожденными уродствами плода и болезнями молодняка в постнатальный период.

У телят в возрасте от 3 до 8 месяцев, полученных от импортных нетелей, ВНА к субгенотипу 1a выявляли в 6,67% случаев в титрах 1,67±0,27; а к субгенотипу 1b – у 13,33% из них в титрах 1,25±0,22 (разница не достоверна, P > 0,05). Показатели инфицированности этой возрастной группы животных статистически различались, однако средние титры специфических антител находились на приблизительно одинаковом уровне. Это говорит о том, что острые вспышки ВД-БС КРС стали следствием отсутствия иммунитета у телят к обоим субгенотипам вируса.

При исследовании 90 проб сыворотки крови от импортных нетелей в возрасте 16-18 месяцев удалось установить значительные различия в количестве серопозитивных животных к обоим субгенотипам вируса и значениях титров ВНА к ним (разница достоверна, P < 0,05). Так, ВНА к субгенотипу 1a выявили у 95,56% животных в высоких титрах (3,83±0,15); тогда как к субгенотипу 1b только у 13,33% животных в титрах 2,17±0,23. Разброс титров антител находился в пределах 1: 2 – 1: 16 к субгенотипу 1b и 1: 2 – 1: 128 к 1a. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что источником возбудителя инфекции в данном случае послужили животные, завезенные из других стран и инфицированные вирусом субгенотипа 1a.

Таблица

Частота выявления титров вируснейтрализующих антител к разным субгенотипам вируса ВД-БС КРС у импортного и местного скота

Возрастная группа, количество голов	Субгенотип вируса ВД-БС КРС				Достоверность разности значений ВНА, (Р)
	1b		1a		
	Серопозитивность животных к вирусу,%	Средние значения ВНА, lg_2	Серопозитивность животных к вирусу,%	Средние значения ВНА, lg_2	%
Импортный скот					
Телята от 3 до 8 мес., 15	13,33	1,25±0,22	6,67	1,67±0,27	Не достоверна
Нетели от 16 до18 мес., 90	13,33	2,17±0,23	95,56	3,83±0,15	99,90
Телки, 11	100,00	3,73±1,12	90,91	4,80±0,34	Не достоверна
Средние значения, 116	21,55	2, 96±0,30	83,62	3,93±0,14	99,00
	Местный скот				
Телята новорожденные, 27	74,07	3,40±0,29	88,89	3,46±0,35	Не достоверна
Телята от 1 до 3 мес., 16	75,00	3,33±0,36	62,50	2,90±0,36	99,90
Телята от 3 до 6 мес., 31	64,52	2,75±0,26	70,97	3,09±0,22	99,00
Нетели, 12	100,00	4,17±0,39	91,67	2,82±0,25	99,90
Телки, 113	92,92	4,32±0,17	93,81	4,42±0,19	Не достоверна
Быки, 22	95,45	3,86±0,27	90,91	4,65±0,26	99,90
Средние значения, 221	85,97	3,94±0,12	87,33	4,01±0,12	Не достоверна

При исследовании парных проб сыворотки крови от импортных нетелей и телят, полученных от них, вируснейтрализующие антитела к субгенотипу 1b вируса ВД-БС КРС выявили в 13,33% проб в титрах 1: 2 – 1: 16, к субгенотипу 1а – в 82,86% проб в титрах 1: 2 – 1: 128, а сероконверсию – только к субгенотипу 1b. Частота ее составила 66,67%.

Теоретически субгенотипы одного генотипа вируса могут не различаться между собой, однако полученные нами данные свидетельствуют о существовании некоторых антигенных различий, выявляемых в серологических реакциях, а также предполагают циркуляцию различных субгенотипов вируса среди животных одного стада. Возможно, это связано с мутациями и рекомбинациями генома вируса.

Наши данные согласуются с результатами зарубежных исследователей, которые сообщали о высокой степени антигенных различий между субгенотипами вируса, коррелирующей с их геномной гетерогенностью [3, 5, 6, 8,].

В связи с этим использование вируса одного субгенотипа в качестве антигена в реакции нейтрализации может давать неполную картину о наличии инфекции в конкретном стаде. Поэтому при массовых эпизоотологических обследованиях стад крупного рогатого скота возрастает роль молекулярно-генетических методов исследований, позволяющих проводить более достоверные различия между субгенотипами вируса.

Эпизоотическая ситуация по ВД-БС КРС во многих странах мира может быть различной, в некоторых из них болезнь полностью ликвидирована. Популяции ви-

руса на различных территориях имеют свои генетические особенности, поэтому при смешивании животных из различных источников может происходить обмен антигенно различающимися вариантами вируса, к которым нет иммунитета у аборигенных или импортных животных.

Так, например, Bachofen C. et al. [3] предполагают, что поддержание стационарно неблагополучных очагов ВД-БС КРС в Швейцарии обусловлено, согласно существующей системе ведения животноводства, ежегодным вводом до 25% новых животных, персистентно инфицированных антигенно различающимися субгенотипами вируса.

Выводы

1. Между субгенотипами вируса внутри одного генотипа существуют антигенные различия, выявляемые в реакции нейтрализации в культуре клеток. Установлены серологические различия двух субгенотипов 1a и 1b первого генотипа вируса ВД-БС КРС.

2. На территории Сибири циркулируют изоляты обоих субгенотипов вируса. В хозяйствах, куда не поступал импортный скот, сероконверсию у телок случного возраста к вирусу субгенотипа 1b установили в 45% случаев, у телят и нетелей в 27,27; к 1a – в 80; одновременно к двум – в 50,76% случаев. При исследовании проб от импортных нетелей и телят, полученных от них, сероконверсию к вирусу субгенотипа 1b выявляли в 66,67% случаев.

3. Естественный иммунитет после контакта животных с вирусом одного субгенотипа не обеспечивает полной защиты животных от суперинфицирования антигенно различающимся субгенотипом. Ввод в стадо, неблагополучное по ВД-БС КРС, импортных животных, иммунных к субгенотипу вируса 1a, но с отсутствием иммунитета к вирусу 1b, спровоцировал острые вспышки инфекции.

РЕЗЮМЕ

При серологическом обследовании животных 7 крупных молочных комплексов в реакции нейтрализации с использованием в качестве антигена штаммов двух субгенотипов вируса первого генотипа выявили наличие вируснейтрализующих антител к обоим субгенотипам, свидетельствующее о циркуляции их среди конкретной популяции животных. Установлены различия в частоте выявления и значениях тиров антител, а также сероконверсии у импортных и местных животных к обоим субгенотипам вируса, объясняющие эпизоотическую ситуацию в конкретном хозяйстве на момент проведения исследований. Риск возникновения повторных вспышек болезни в стационарно неблагополучных по вирусной диарее стадах связан с вводом новых животных, инфицированных различающимися субгенотипами вируса.

SUMMARY

The serological investigations of 7 large dairy farms in serum neutralization test with use as an antigene strains of two subgenotypes of a virus belonging to first genotype have revealed presence of antibodies to both subgenotypes showing of circulation them among a concrete population of animals. The distinctions in frequency of detection and antibodies titers, and also seroconversion in imported and aborigen animals to both subgenotypes of virus explaining epidemiological situation in a concrete farm on the moment of investigations are established. The risk of occurrence of repeated BVD outbreaks in permanently infected herds is connected to input of new animals infected with differing subgenotypes of a virus.

Литература

1. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планиро-вания экспериментов / И.П. Ашмарин, Н.Н. Васильев, В.А. Амбросов; Изд-во Ленингр. ун-та. – Ленинград, 1974.- 76 с.
2. Жидков С.А. Роль вирусной диареи в этиологии респираторных и желудочно-кишечных болезней телят / С.А. Жидков, А.И. Лебедев, М.М. Гоголев, Г.Ф. Коромыслов// Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 1995. - №3. - С. 50-53.
3. Bachofen C. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation / C. Bachofen, H. Stalder, U. Braun [et al.] // Veterinary microbiology. - 2008. - Vol.131. - № 1-2. - P. 93-102.
4. Fulton R.W. Bovine viral diarrhea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes / R.W. Fulton, J.F Ridpath, A.W. Confer [et al.] // Biologicals. - 2003. – Vol.31. - № 2. - P. 89-95.
5. Fulton R.W. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. / R.W. Fulton , J.F. Ridpath, S. Ore [et al.] // Veterinary microbiology.- 2005. - Vol. 30. - №111(1-2).- P.35-40.
6. Jones L. Comparison of neutralizing antibodies to type 1a, 1b, and 2 bovine viral diarrhea virus from experimentally infected and vaccinated cattle / L. Jones, H. Van Campen, Z.C. Xu [et al.] // Bovine Practitioner. – 2001. - Vol. 35. – P. 137-140.
7. Lindberg A.L.E. Bovine viral diarrhea virus infections and its control. A review / A.L.E. Lindberg // Veterinary Quarterly. - 2003.- Vol. 5 - №1. - P. 1-16.
8. Nagai M. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhea virus in Japan / M. Nagai, T. Ito, S. Sugita [et al.] // Archives of virology. – 2001. №146 (4) – P. 685-696.
9. Ridpath J.F. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes / J.F. Ridpath, S.R. Bolin, E.J. Dubovi // Virology.- 1994. – Vol.205. – P.66-74.
10. Ridpath J.F. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs / J.F. Ridpath // Prev. Vet. Med. - 2005. – Vol.15 - № 72 (1-2) – P. 17-30.
11. Saliki J.T. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections / J.T. Saliki, E.J. Dubovi // Vet. Clin. Food Anim. - 2004. - № 20. - P.69-83.
12. Vilcek S. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups / S. Vilcek, D.J. Paton, B. Durkovic [et al.] // Arch. Virol. - 2001.- №146.- P. – 99-115.